



USO DE ESPECTROSCOPIA VISIBLE E INFRARROJO CERCANO PARA LA DETECCIÓN DE ADULTERACIÓN DE LECHE POR AGUADO

MÁSTER EN CIENCIA E INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

Octavio Sánchez Blanco

Victoria Cortés López

Pau Talens Oliag

ETSIAMN

USO DE ESPECTROSCOPIA VISIBLE E INFRARROJO CERCANO PARA LA DETECCIÓN DE ADULTERACIÓN DE LECHE POR AGUADO

Octavio Sánchez Blanco, Victoria Cortés López, Pau Talens Oliag¹

RESUMEN

En el presente estudio se ha evaluado el uso de técnicas espectroscópicas en el rango visible e infrarrojo cercano para detectar la adulteración de leche por aguado. Se caracterizaron muestras de leche de diferentes casas comerciales, evaluándose el contenido en proteínas, grasas, lactosa, cloruros, cenizas y extracto seco. Las muestras se adulteraron del 0.25% al 50% con agua Milli-Q ultrapura. Tanto a las muestras sin adulterar como a las muestras adulteradas se les determinó la constante molecular simplificada, el extracto seco desengrasado, la densidad y el punto de congelación. Todos los parámetros son capaces de detectar adulteraciones inferiores a un 10%, siendo de todos los parámetros la densidad y la constante molecular simplificada los que mayor precisión en la detección tienen. Se relacionaron los espectros en el rango visible e infrarrojo cercano con dichos parámetros, mediante modelos estadísticos a partir de análisis multivariantes, obteniéndose buenas correlaciones con valores de R^2 entre 0.85 y 0.93 y con bajos valores de sus errores cuadráticos medios.

PALABRAS CLAVE: espectroscopia visible, espectroscopia infrarroja cercana, leche, adulteración

RESUM

En el present estudi s'ha avaluat l'ús de tècniques espectroscòpiques en el rang visible i infraroig pròxim per a detectar l'adulteració de la llet per aigualit. Es van caracteritzar mostres de llet de diverses cases comercials, avaluant-se el contingut en proteïnes, greixos, lactosa, clorurs, cendres i extracte sec. Les mostres s'adulteraren del 0.25% al 50% amb aigua Milli-Q ultrapura. Tant a les mostres sense adulterar com a les mostres adulterades se'ls va determinar la constant molecular simplificada, l'extracte sec desgreixat, la densitat i el punt de congelació. Tots els paràmetres són capaços de detectar adulteracions inferiors a un 10%, sent de tots els paràmetres la densitat i la constant molecular simplificada els que més precisió en la detecció tenen. Es van relacionar els espectres en el rang

¹pautalens@tal.upv.es. Departamento de Tecnología de Alimentos. Universitat Politècnica de València. Camino de Vera s/n, 46022 Valencia.

visible i infraroig pròxim amb els paràmetres mencionats, per mitjà de models estadístics a partir d'anàlisi multivariants, obtenint-se bones correlacions amb valors de R^2 entre 0.85 i 0.93, i amb baixos valors dels seus errors quadràtics mitjans.

PARAULES CLAU: espectroscòpia visible, espectroscòpia infraroig pròxim, llet, adulteració

ABSTRACT:

In the present work, the use of spectroscopic techniques in the visible and near infrared range was evaluated to detect water added in milk. Milk samples from different trademarks were characterized and their content in proteins, fat, lactose, chlorides, ashes and dry matter was evaluated. Samples were adulterated from 0.25 to 50% with ultrapure Milli-Q water. Simplified molecular constant, fat free dry matter, density and freezing point were determined for non-adulterated and adulterated samples. These parameters were able to detect adulterations lower to 10%. Density and simplified molecular constant were the most precise parameters. Visible and near infrared spectra were related with these four parameters by statistical models. These models were created by multivariate analysis, obtaining good correlations with R^2 values between 0.85 and 0.93 and low values of the mean squared errors.

KEYWORDS: visible spectroscopy, near infrared spectroscopy, milk, adulteration

1. INTRODUCCIÓN

La adulteración de la leche es un problema para la industria láctea en muchos países del mundo que conlleva pérdidas económicas, deterioro de la calidad de los productos finales y riesgos para la seguridad de los consumidores (Mabrook y Petty, 2003; Das *et al.*, 2011). Se usan diferentes tipos de adulterantes para obtener distintos beneficios. Como ejemplos de adulteraciones se puede hablar de: aguado de la leche, mezclado de leches de diferentes especies, así como de la adición de suero de leche, compuestos nitrogenados (urea o melanina) o grasas animales o vegetales. De todas ellas, una de las maneras más simples y más antiguas de adulterar la leche es mediante la adición de agua para aumentar su volumen (Das *et al.*, 2015). Esto supondría un fraude económico al intentar vender un alimento con un menor valor nutritivo.

Existen varios parámetros que permiten detectar el aguado de leche entre los que se encuentran la determinación del extracto seco desengrasado, el análisis de la constante molecular simplificada, la determinación del punto de congelación y la determinación de la densidad de la leche. Algunas de las desventajas de estas determinaciones es que son económicamente caras,

consumen mucho tiempo y provocan la destrucción de la muestra analizada. Por ello, es necesario desarrollar sistemas rápidos, fiables y no destructivos que permitan detectar este tipo de fraude.

A lo largo de los años se han ido desarrollando distintos métodos de control para evaluar la autenticidad de la leche y de otros productos lácteos. Se han desarrollado métodos basados en espectroscopia eléctrica donde se diferenciaba leche sintética de leche natural (Sadat *et al.*, 2006), conductividad eléctrica en el que se estudiaba su evolución al adicionar agua en leches enteras y desnatadas para detectar el aguado (Mabrook y Petty, 2003), análisis de imagen para la detección de adulteración por aguado y por adición de NaOH (Santos *et al.*, 2011, Santos *et al.*, 2012), combinación de técnicas de cromatografía líquida y espectroscopia de masas para la detección de adulteraciones para aumentar el contenido de nitrógeno en alimentos ricos en proteínas como los productos lácteos (MacMahon *et al.*, 2012) o espectroscopia visible y/o ultravioleta-visible para la detección de adulteración mediante la adición de leche en polvo (Hsieh *et al.*, 2011).

Sin embargo, a pesar de que la espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR) ha sido ampliamente utilizado para la determinación de varias propiedades de la leche (por ejemplo, determinación de grasa, proteína o lactosa) (Etzion *et al.*, 2004; Kawasaki *et al.*, 2008), pocos estudios se han realizado para controlar la autenticidad de leche utilizando NIR (Santos *et al.*, 2013). El uso de esta técnica se está extendiendo en la industria alimentaria ya que se trata de una técnica que no requiere apenas pretratamiento, es no destructiva, rápida y no requiere el uso de agentes químicos. Además, la información espectral obtenida a partir de un alimento se puede considerar como una huella característica, la cual puede ser útil para describir la calidad o las peculiaridades del alimento analizado.

En el presente trabajo se plantea el uso de la espectroscopia visible e infrarrojo cercano combinado con métodos quimiométricos para detectar adulteraciones de leche por aguado.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materia prima

Como materia prima se ha trabajado con 6 leches de vaca no adulteradas (LNA) de diferentes marcas comerciales procedentes de un supermercado local.

2.2 Preparación de las muestras de leche adulteradas

Una vez caracterizadas composicionalmente las LNA, se procedió a la preparación de las muestras de leche adulteradas (LA). El rango de adulteración con el que se ha trabajado es desde un 0.25% a 50%. Para cada leche no adulterada se realizó un total de 30 adulteraciones (0%, 0.25%, 0.5%, 0.75%, 1%, 1.25%, 1.5%, 1.75%, 2%, 2.25%, 2.5%, 3%, 3.5%,

4%, 4.5%, 5%, 7.5%, 10%, 13.5%, 15%, 20%, 23.5%, 25%, 30%, 33.5%, 35%, 40%, 43.5%, 45%, 47.5%, 50%). Dichas adulteraciones se llevaron a cabo por aguado mediante la utilización de agua Milli-Q ultrapura con una conductividad de 0.055 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Tanto las muestras LNA como las muestras LA se prepararon y analizaron por triplicado, obteniéndose por tanto un conjunto de 558 muestras.

2.3 Análisis realizados

2.3.1 ANÁLISIS DESTRUCTIVOS/COMPOSICIONALES

A cada una de las muestras LNA se le analizó su contenido en proteínas, grasa, lactosa, cloruros, cenizas y extracto seco. El contenido proteico se determinó en base al nitrógeno total aplicando el método Kjeldahl (Boletín Oficial del Estado, 20 de julio) para el cual a 5 g de leche se le adicionaba 10 mL de ácido sulfúrico al 98% en presencia de un catalizador mixto (sulfato potásico, sulfato de cobre y selenio en proporción 10:1:0.1) para transformar el nitrógeno de los compuestos orgánicos en nitrógeno amoniacal, el cual se liberó por adición de hidróxido de sodio. El nitrógeno obtenido se destiló y recogió en una solución de ácido bórico para una valoración final con ácido clorhídrico 0.1 N y determinar así el contenido proteico.

El análisis del contenido en grasa se determinó en base al método Gerber (Boletín Oficial del Estado, 20 de julio) a partir de 11 mL de cada leche a la que se le adicionó ácido sulfúrico al 90% y alcohol isoamílico en butirómetros Gerber de dimensiones estandarizadas (DIN 12836-1:1969-12) para conseguir la liberación total de la grasa. Se separó la misma por centrifugación mediante una centrifuga Gerber Nova Safety 3670 (Funke Gerber, Alemania) y medida volumétrica directamente en los butirómetros.

La determinación del contenido en lactosa (Boletín Oficial del Estado, 20 de julio) se realizó a partir de 10 mL del filtrado de cada leche mediante ácido tungsténico, y se le adicionaron 5 mL de yoduro potásico al 10% y 20 mL de cloramina-T 0.04 N que reaccionaron durante 90 minutos en oscuridad. La reacción se frenó con 5 mL de ácido clorhídrico 2 N y finalmente se valoró con una solución de tiosulfato sódico 0.05 N usando como indicador una solución de almidón soluble al 1%. Es importante tener en cuenta que cada mililitro de solución de tiosulfato 0.05 N empleado en la valoración equivale a 0.00720 g de lactosa monohidratada.

El contenido en cloruros se estimó mediante la utilización de un clorurímetro Sherwood Chloride Analyzer 926 Mk II (Sherwood Scientific, Reino Unido) por valoración coulombimétrica de 10 mL de la leche donde el punto final de dicha valoración se determinó cuando el exceso de iones plata provoca un cambio en la conductividad.

Para la determinación del contenido en extracto seco se cuantificó el residuo, expresado en porcentaje en peso, obtenido tras la desecación de 2-3 g de cada una de las muestras de leche (Boletín Oficial del Estado, 20 de julio). Cada muestra se sometió a un calentamiento en estufa de convección (Incudigit, J.P Selecta, España) a 60 °C durante 24 horas para evitar la acumulación de vapor, seguido por una segunda etapa de secado en estufa

a vacío (VacíoTem-T, J.P Selecta, España) a 100 °C y a una presión de -0.9 bar. Se dio por finalizado el análisis cuando los pesos medidos se mantuvieron constantes.

En cuanto al análisis del porcentaje de cenizas, éste se llevó a cabo por incineración en un horno de mufla (367PF, J.P Selecta, España) a 550°C durante 8 horas (Boletín Oficial del Estado, 20 de julio).

2.3.2. DETERMINACIÓN Y CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS DE DETECCIÓN DE LA ADULTERACIÓN

En el presente trabajo se determinaron cuatro parámetros para cada una de las leches estudiadas (LNA y LA): la constante molecular simplificada, el extracto seco desengrasado, la densidad y el punto de congelación.

La constante molecular simplificada (CMS) es un parámetro que depende principalmente del contenido en lactosa y cloruros disueltos en el suero de la leche el cual puede ser determinado a través de la ecuación 1.

$$CMS = \frac{1000}{s}(L + 11.9 NaCl) \quad (\text{Ecuación 1})$$

Siendo;

L = Lactosa (g/L)

NaCl = cloruros (g/L)

S = volumen de suero proporcionado (mL)

El extracto seco desengrasado o magro (ESD) se evaluó a partir de la diferencia entre el valor de extracto seco total y el contenido en grasas.

La densidad se determinó para cada una de las leches (LNA y LA) utilizando un lactodensímetro modelo Densito 30-PX (Mettler Toledo, Suiza).

El punto de congelación (PC) de las muestras de LNA se determinó introduciendo 40 mL de leche en un crioscopio atemperado a -15°C. Las muestras se mantuvieron en constante agitación y se iba anotando como iba cambiando la temperatura con el tiempo hasta no obtener cambios de temperatura durante un intervalo amplio de tiempo.

Para el caso de las muestras de LA, el punto de congelación se estimó a través de la ecuación de Robinson y Stokes (Robinson y Stokes, 1965) (ecuación 2).

$$-\ln a_w = 0.004207\Delta T_f + 2.1 \cdot 10^{-6} \Delta T_f \quad (\text{Ecuación 2})$$

Siendo,

ΔT_f = la diferencia la temperatura de congelación del agua pura (273,15 K) y la temperatura de inicio de congelación de la leche.

a_w = actividad del agua.

2.4.3. ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICOS NO DESTRUCTIVOS

Los espectros de reflexión de las muestras, en la región del visible (VIS), se midieron directamente usando una cubeta de 50x38x23 mm (Figura 1) tras comprobar que el espesor era el suficiente para asegurar la opacidad de la muestra. El espectro de reflexión se midió entre 400-700 nm, cada 10 nm, mediante la utilización de un espectrocolorímetro MINOLTA modelo CM-700d (Minolta CO. Tokio, Japón). Las mediciones de los espectros se obtuvieron por triplicado para cada muestra.

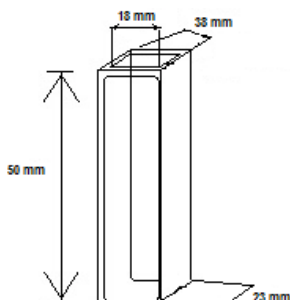


Figura 1. Medidas de cubeta de plástico, empleada en la medición de los espectros.

Los espectros en la región VIS-NIR y NIR se midieron en modo reflexión utilizando un espectrómetro multicanal (AVS-DESKTOP-USB2, Avantes BV, Holanda) equipado con dos detectores, uno sensible en la región VIS-NIR entre 595 y 1100 nm con una resolución de 0.255 nm y otro en la región NIR entre 888 y 1795 nm (AvaSpec-U LS2048-USB2-RM y AvaSpec-NIR256-1.7-RM, Avantes BV, Holanda) con una resolución de 3.53 nm, una fuente de iluminación halógena de tungsteno (AvaLight-HAL-S, Avantes BV, Holanda) y una sonda de reflexión con una geometría de 45° para minimizar la reflexión en la calibración (FCIR-7IR200-2-45-ME, Avantes BV, Holanda). La calibración fue hecha con una referencia blanca especial (99%) hasta obtener una saturación del 90%.

Antes de las medidas espectroscópicas las muestras fueron atemperadas a 15° C. La medición se realizó colocando la ventana del espectrocolorímetro o la sonda, según el equipo de medida, directamente sobre la cubeta y se midió en tres puntos diferentes. Cada punto de medición se escaneó cinco veces. Las lecturas se promediaron automáticamente para cada señal del espectro. Se fijó un tiempo de integración de 90 ms para el detector sensible en la región VIS-NIR y de 700 ms para el detector sensible en la región NIR. Los datos espectrales medidos en porcentaje de reflexión se transformaron en valores de absorbancia aparente mediante la ecuación 3.

$$A = -\log\left(\frac{1}{R}\right) \quad (\text{Ecuación 3})$$

Siendo,

A= Absorbancia
R= Reflectancia

2.4 Análisis estadístico

Los espectros y las variables obtenidas de los análisis composicionales (CMS, ESD, densidad y PC) se estructuraron en tres matrices (una para cada espectro) donde las filas representaban las 558 muestras (186 muestras por sus 3 réplicas) y las columnas representaban el número de variables (las variables proporcionadas por los espectros y las variables proporcionadas por los análisis composicionales).

Previamente, se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) para cada una de las matrices con el fin de visualizar toda la información contenida en la tabla de datos. Un PCA constituye la base para los métodos de regresión (Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales, PLS), contribuyendo a la búsqueda de las mejores combinaciones lineales entre las variables y a detectar posibles outliers. Se encontraron 5 posibles outliers en la matriz de datos para el colorímetro convencional (espectroVIS), 4 posibles outliers para la matriz de datos del detector sensible en el rango VIS-NIR y 11 posibles outliers en la matriz de datos para el detector sensible en el rango NIR.

A continuación, se desarrollaron tres modelos PLS (VIS, VIS-NIR y NIR) para cada una de las variables a estudiar utilizando el software estadístico The Unscrambler® (CAMO Software AS, Oslo, Noruega). Dichos modelos se crearon para predecir CMS, ESD, densidad y PC en base a las medidas espectrales. Dicha técnica es bastante útil cuando se requiere la predicción de un conjunto de variables dependientes a partir de un conjunto de variables independientes (Abdi, 2010). La variable dependiente (Y) representaba las variables (CMS, ESD, densidad o PC) calculadas en base a las propiedades composicionales analizadas, mientras que los espectros VIS, VIS-NIR y NIR representaban las variables independientes (X) siendo inicialmente 39 variables para el espectro VIS, 1992 variables para el espectro VIS-NIR y 256 para el espectro NIR. Tras los pretratamientos de reducción y eliminación de ruidos de los espectros el número final de las variables X quedó en 39 variables para el espectro VIS, 277 para el espectro VIS-NIR y 214 para el espectro NIR. Todos los espectros de reflectancia de las muestras fueron transformados a valores de absorbancia aparente (ecuación 3) para obtener correlaciones lineales entre los espectros y las variables de análisis, y además el espectro VIS-NIR fue sometido a un smoothing de 9 puntos, utilizando el software estadístico The Unscrambler Version 9.7 (CAMO Software AS, Oslo, Noruega).

Las muestras se separaron aleatoriamente en dos poblaciones. Una población, que contenía el 75% de las muestras (N= 372), se utilizó para el desarrollo y evaluación del modelo mediante validación cruzada, mientras que la otra población, que contenía el 25% de las muestras restantes (N=186), se utilizó como conjunto independiente de predicción. Se evaluó el rendimiento de los modelos a partir de los valores obtenidos del error de la raíz cuadrada de la media de la calibración (RMSEC), la raíz media del error cuadrado de la validación cruzada (RMSECV), el error de la raíz cuadrada de la media de la predicción (RMSEP), el coeficiente de determinación (R^2),

el número de longitudes de onda requeridas (#W) y el número de variables latentes requeridas (#LV).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis composicionales de las muestras de LNA y su estimación para las muestras LA.

La Tabla 1 presenta los valores composicionales (proteínas, grasa, lactosa, cloruros, cenizas y extracto seco) obtenidos para las distintas LNA analizadas. Se observa que las LNA analizadas obtienen valores próximos a los valores medios observados para leche de vaca por otros autores (Astigarraga, 2011), donde las grasas se encontraban alrededor de un 35-45 g/L y en este estudio se encuentran valores ligeramente inferiores (31-33 g/L). Las proteínas de las muestras analizadas suelen presentar valores entre 32 y 36 g/L, variando en este caso en un rango similar (31-34 g/L), mientras que los valores de lactosa se mueven dentro del rango entre 47 y 52 g/L en leches enteras, tal como es de esperar. Por último, tanto los valores obtenidos de los cloruros como del extracto seco se mueven dentro de los valores indicados por la bibliografía (1-1.2 g/L y 120-130 g/L, respectivamente).

A partir de los valores composicionales determinados para las distintas LNA (tabla 1) se estimaron los valores composicionales de las LA a partir de los diferentes porcentajes de agua Milli-Q adicionada para llevar a cabo la adulteración. Se utilizó agua Milli-Q para asegurar la correcta estimación de los valores composicionales ya que se trata de agua ultrapura y por tanto no contiene sales en disolución que puedan interferir en los valores de concentración obtenidos. La tabla 2 presenta los valores medios, máximos, y mínimos del contenido en proteínas, grasa, lactosa, cloruros, extracto seco, de todas las muestras estudiadas. Como es de esperar, se puede observar en todos los casos como la adición sucesiva de agua como adulterante disminuye la concentración de los componentes debido a la dilución de las muestras.

Tabla 1. Valores composicionales medios (lactosa, proteínas, grasa, cloruros, cenizas y extracto seco) obtenidos para las distintas LNA analizadas

	Leche A	Leche B	Leche C	Leche D	Leche E	Leche F
Lactosa (g/L)	47 ± 3	46 ± 1	48 ± 2	48 ± 2	50 ± 2	48 ± 2
Proteína (g/L)	31.9 ± 1.3	31.8 ± 0.4	33.6 ± 0.5	34.7 ± 0.6	33.4 ± 0.1	34.6 ± 0.3
Grasa (g/L)	31.7 ± 1.5	31.5 ± 0.0	32.0 ± 0.2	31.7 ± 1.5	31.3 ± 2.1	33.3 ± 1.2
Cloruros (g/L)	1.0060 ± 0.0004	1.0400 ± 0.0001	1.0440 ± 0.0003	0.9550 ± 0.0003	0.9750 ± 0.0002	0.9900 ± 0.0006
Cenizas (g/L)	7.3 ± 0.1	7.3 ± 0.1	7.0 ± 0.6	7.3 ± 0.1	7.2 ± 0.0	7.5 ± 0.0
Extracto seco (g/L)	123.0 ± 1.0	126.8 ± 1.1	126.5 ± 0.7	127.6 ± 1.0	127.5 ± 0.9	127.6 ± 0.6

Tabla 2. Valores máximos, mínimos y medias de la composición para las muestras LNA y LA estudiadas.

	Leche A			Leche B		
	Media	Máximo	Mínimo	Media	Máximo	Mínimo
Lactosa (g/L)	39.855	47.310	23.655	38.811	46.071	23.035
Proteína (g/L)	26.887	31.916	15.958	26.747	31.750	15.875
Grasa (g/L)	26.677	31.667	15.833	103.631	31.500	15.750
Cloruros (g/L)	0.847	1.006	0.503	0.876	1.040	0.520
Extracto seco (g/L)	103.161	123.032	60.560	106.397	126.790	62.444
	Leche C			Leche D		
	Media	Máximo	Mínimo	Media	Máximo	Mínimo
Lactosa (g/L)	40.161	47.674	23,837	40.573	48,163	24,081
Proteína (g/L)	28.272	33.561	16,781	29.195	34,656	17,328
Grasa (g/L)	26.957	32.000	16.000	26.677	31.667	15,833
Cloruros (g/L)	0.879	1.044	0.522	0.809	0.955	0.478
Extracto seco (g/L)	106.155	126.502	62.294	107.070	127.639	62.843
	Leche E			Leche F		
	Media	Máximo	Mínimo	Media	Máximo	Mínimo
Lactosa (g/L)	42.085	49.958	24.979	40.206	47.727	23.864
Proteína (g/L)	28.105	33.363	16.681	29.185	34.645	17.322
Grasa (g/L)	104.111	31.333	15.667	28.081	33.333	16.667
Cloruros (g/L)	0.821	0.975	0.488	0.834	0.990	0.495
Extracto seco (g/L)	106.997	127.567	62.744	107.055	127.587	62.784

3.2 Evolución de los parámetros de detección de la adulteración

Se emplearon los parámetros (CMS, ESD, densidad y PC) para la detección de la adulteración de las muestras de leche. Una LNA debe tener valores de CMS superiores a 70 (Alais, 1985), valores de ESD superiores a 87 g/L, la densidad debe estar alrededor de 1.029 g/cm³ (Belitz y Grosch, 2013) y por último, el PC debe tener un valor en torno a -0,5335 °C (Kamthania *et al.*, 2014).

La figura 2 presenta la evolución de los parámetros CMS, ESD, densidad y PC para las muestras analizadas (LNA y LA).

Se observa que para CMS, los valores inicialmente oscilan entre 71 y 73, lo que indica que se parte de LNA. Valores inferiores a 70, indican que se ha producido adulteración en la leche. En la figura 2 se observa cómo va disminuyendo el valor de la constante, debido a la adición de agua, hasta llegar a valores entre 34 y 35.

Se obtuvieron valores de los parámetros ESD para las LNA entre 91 y 96 g/L. La adulteración se detectó a partir de valores inferiores a 87 g/L (Alais, 1985). A medida que se fue añadiendo agua, el ESD decreció hasta valores entre 44 y 47 g/L. La disminución de la concentración de ESD es lógica debido a la dilución de la leche a medida que se adiciona agua.

Para PC se observa una tendencia ascendente a medida que se adultera la leche, obteniéndose valores para las LNA entre -0.5699 y -0.5938 °C. El máximo valor aceptable del PC para considerar no adulterada una muestra

de leche es de $-0,5335\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Kamthania *et al.*, 2014). Al aumentar la proporción de agua, el PC aumenta su valor, obteniéndose puntos de congelación para las LA cada vez más cercanos al valor correspondiente al agua pura ($0\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Figura 2).

La densidad de leche de vaca oscila entre los valores $1,029$ y $1,039\text{ g/cm}^3$ a $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Belitz y Grosch, 2013). Las densidades de las LNA presentaban valores cercanos a $1,030\text{ g/cm}^3$ y a medida que se adulteraban con agua, disminuye progresivamente hasta alcanzar valores entre $1,013$ y $1,014\text{ g/cm}^3$. La adición de agua Milli-Q a la leche aproxima los valores de densidad de las LA a la correspondiente a agua pura a $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ que es $0,9991\text{ g/cm}^3$ (Helbing y Burkart, 1985).

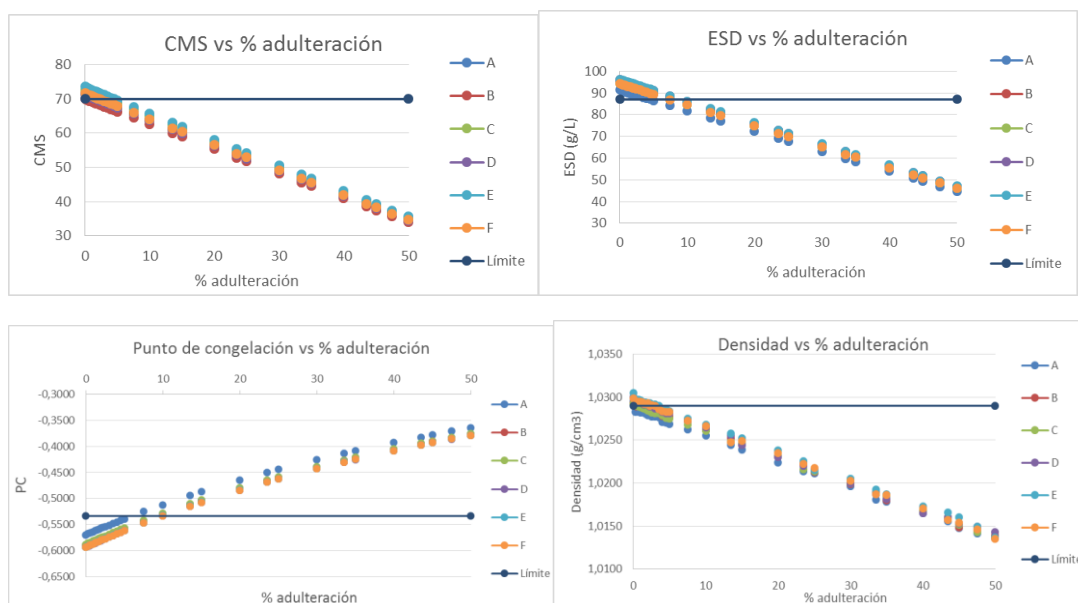


Figura 2. Evolución de los parámetros CMS, ESD, PC y densidad para las muestras analizadas (LNA y LA).

La Tabla 2 presenta a partir de qué porcentaje de agua adicionada puede ser detectada la adulteración para cada una de las leches estudiadas y para cada uno de los parámetros estudiados.

Tabla 2. Porcentajes de detección de adulteración a partir de los cuales se detectó el agüado según el parámetro utilizado.

Detección	Leche A	Leche B	Leche C	Leche D	Leche E	Leche F
CMS	2%	0.25%	3.50%	1.75%	5%	2.25%
ESD	5%	10%	10%	10%	10%	10%
PC	7.5%	10%	10%	10%	10%	10%
Densidad	0.25%	0.50%	0.75%	2.25%	4%	3.50%

El CMS y la densidad de las muestras fueron los parámetros que revelaron la adulteración a valores más bajos, 0,25-5 % y 0,25-4 %

respectivamente. El aumento del PC y los valores de ESD detectaron la adulteración a mayores porcentajes de agua añadida. En el caso del ESD, éste depende de las determinaciones analíticas donde se evalúan los valores de extracto seco total, los cuales son difíciles de medir con precisión (Alais, 1985).

3.3 Análisis espectroscópicos no destructivos como método de detección de la adulteración.

En primer lugar, se calcularon las coordenadas en el espacio de color CIEL*a*b* y a partir de éstas, se determinó el índice de blancura (WI) y la diferencia de color (ΔE) con respecto a la LNA. Se observó un incremento de los valores de ΔE en todas las leches analizadas a partir de porcentajes de adulteración entre el 7.5 y el 15% (Figura 3).

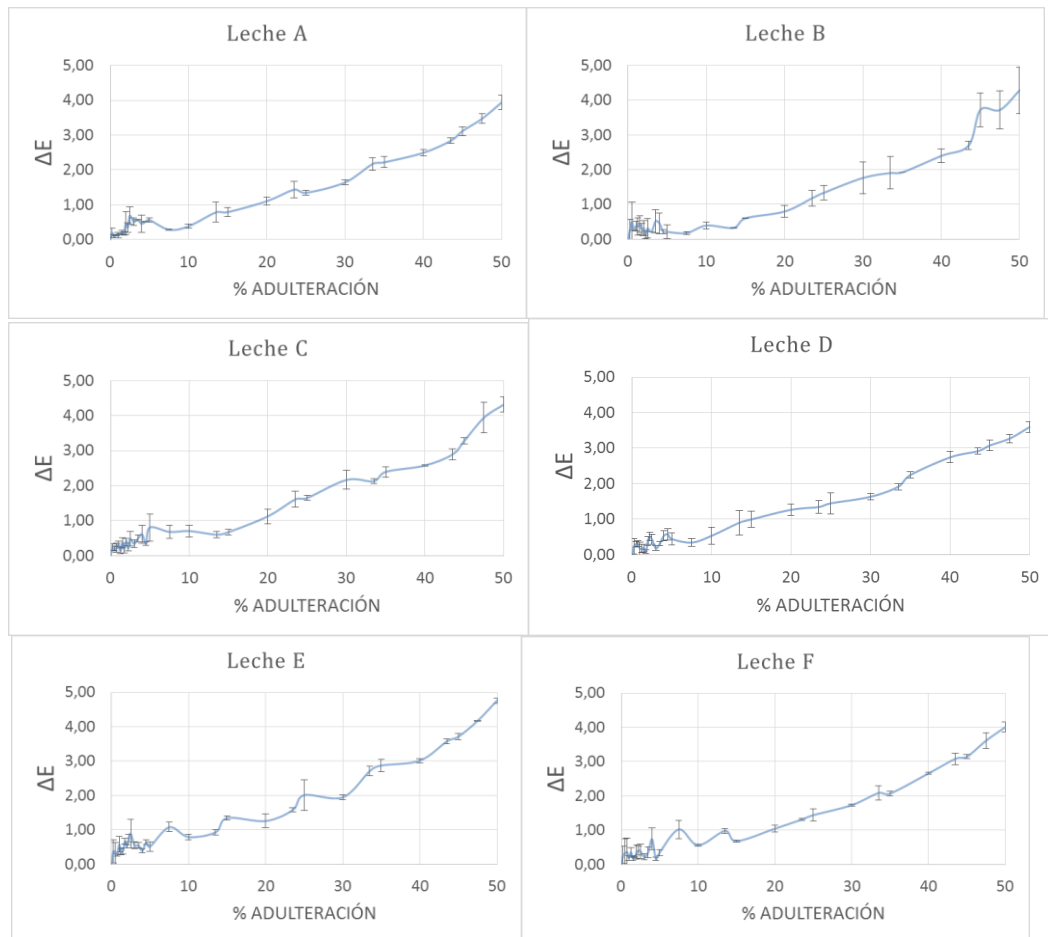


Figura 3. Evolución de las diferencias de color (ΔE) en función del porcentaje de adulteración para las distintas muestras de leche.

Aun así, se consideró que la diferencia de color no era significativa ya que no se superan las 5 unidades en ninguno de los casos (McDonald y Smith, 1995). Analizando el índice de blancura (WI), se observaron menores variaciones a medida que se le adiciona agua (Figura 4). Esto puede ser debido a la opacidad que presenta la leche y a los múltiples efectos de

dispersión de la luz causados por las micelas de caseína y glóbulos de grasa de diferente tamaño (Jääskeläinen *et al.*, 2001; Melfsen *et al.*, 2012).

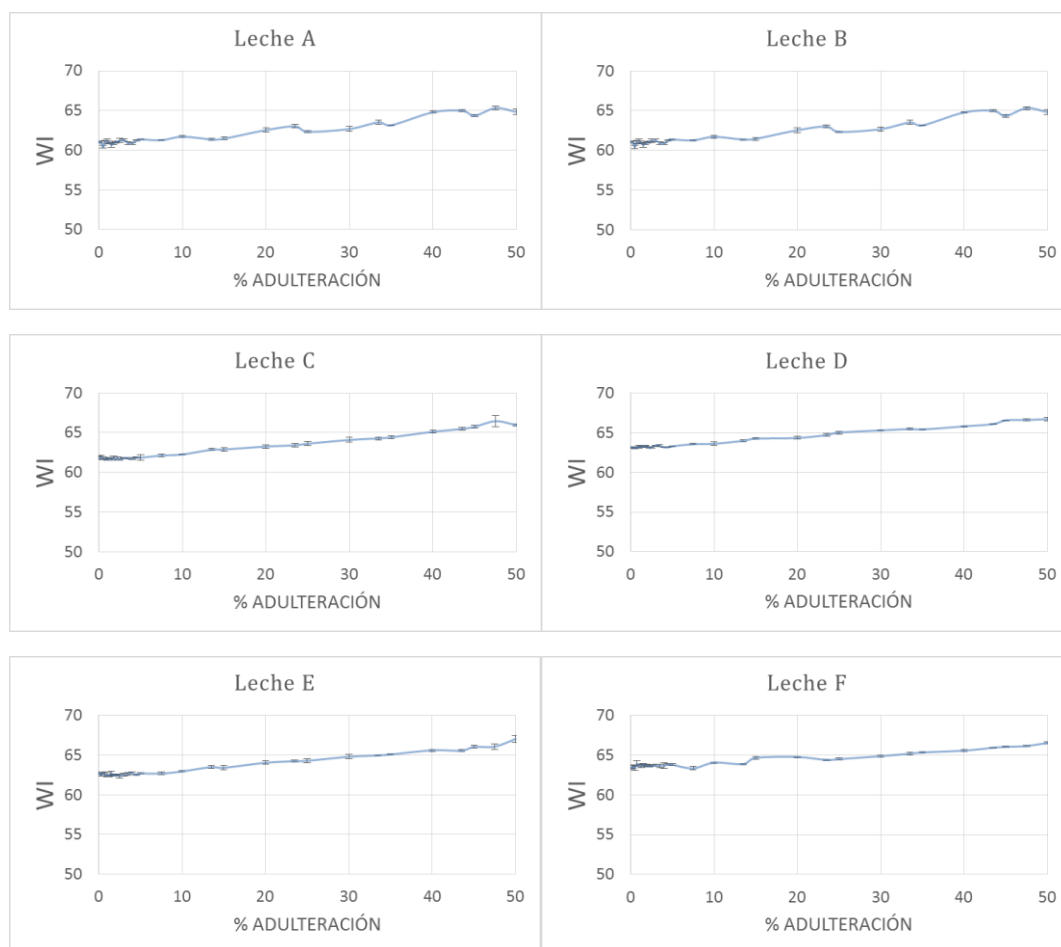


Figura 4. Evolución del índice de blancura (WI) en función del porcentaje de adulteración para las distintas muestras de leche.

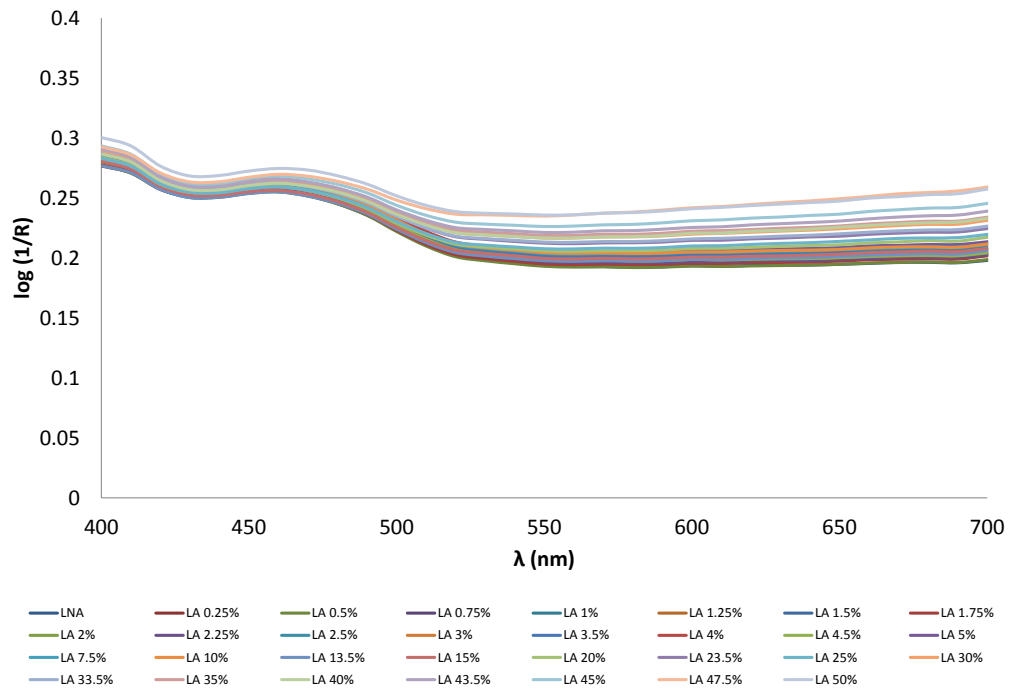


Figura 5. Espectros típicos en la región visible para la leche C

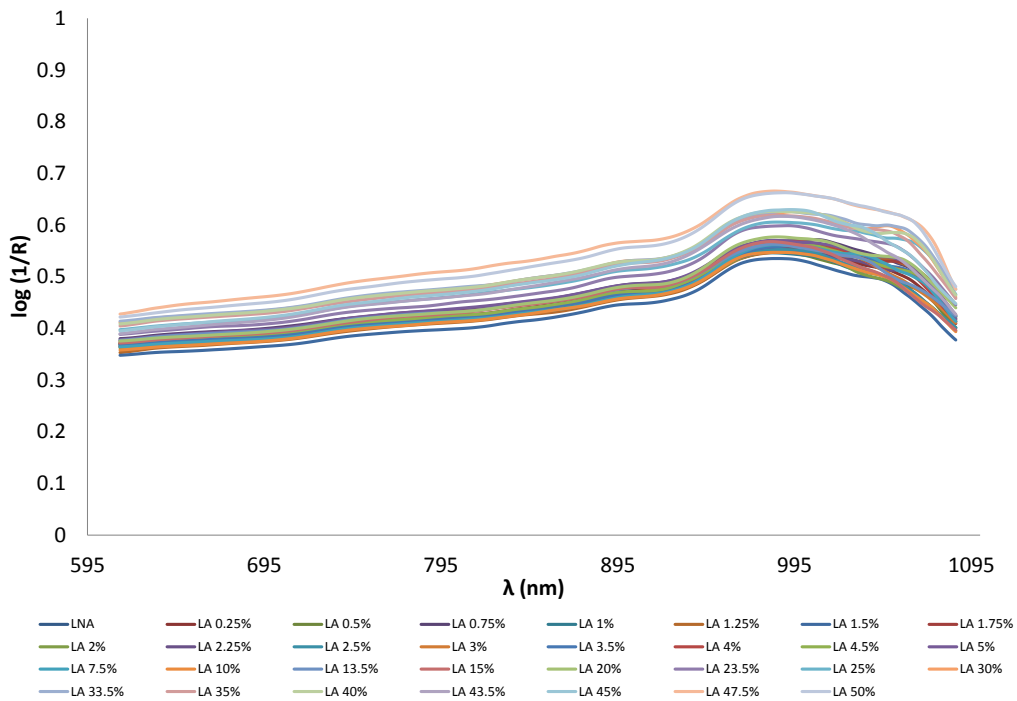


Figura 6. Espectros típicos en la región VIS-NIR para la leche C

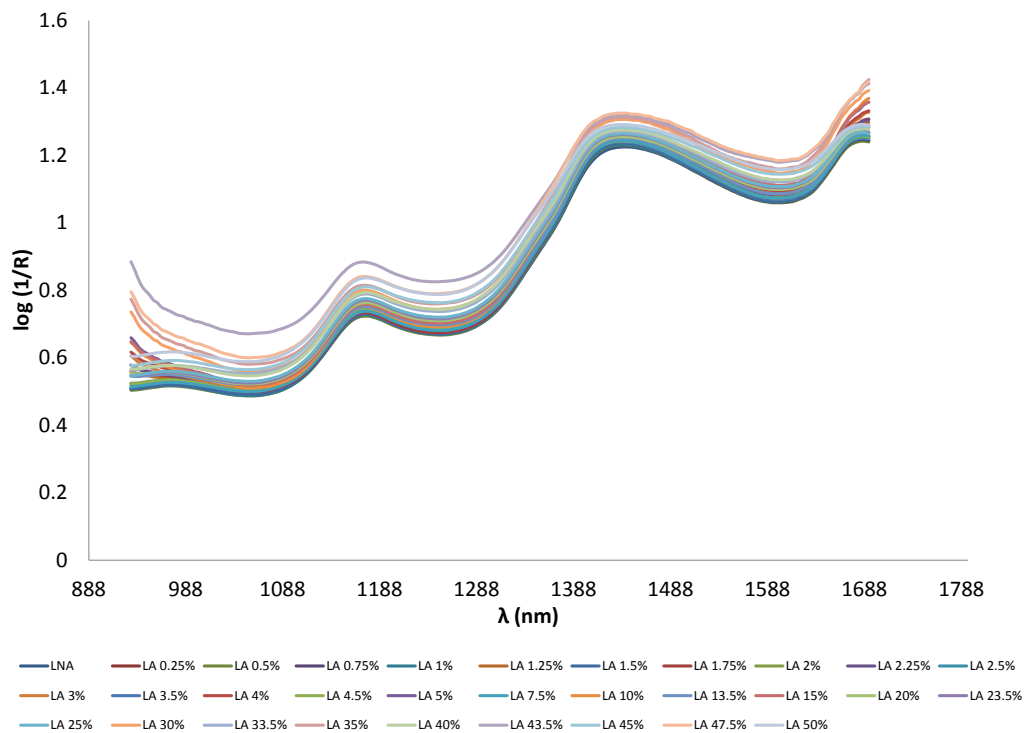


Figura 7. Espectros típicos en la región NIR para la leche C

3.4. Correlación entre los espectros y los parámetros de detección adulteraciones.

Con el fin de ver si los espectros en el rango VIS, VIS-NIR y NIR son capaces de predecir el grado de adulteración de las distintas leches, se desarrollaron 4 modelos (uno para cada parámetro de detección analizado: CMS, ESD, densidad y PC) mediante PLS relacionan las medidas espectrales con dichos parámetros. En la Tabla 3 se muestra los valores de RMSEC, RMSECV, RMSEP, R^2 y #LV para los distintos modelos. En todos los casos y para todos los rangos espectrales estudiados, se obtuvieron bajos valores de RMSEC y RMSECV, y altos valores de R^2 , lo que se traduce en un buen rendimiento de los modelos.

Con el fin de simplificar los modelos se procedió a la identificación y detección de aquellas longitudes de onda que más información podrían aportar al estudio consiguiendo así altas correlaciones estadísticas para un tiempo de integración mucho más breve en la práctica. La Tabla 4 muestra las longitudes de onda seleccionadas. Se observó, para los distintos parámetros de detección de adulteraciones como algunos valores de longitudes de onda se repetían (en negrita). Por ejemplo, a 955 nm y 976 nm, correspondientes al pico observado en el espectro VIS-NIR, localizado alrededor de 970 nm. Además, se detectaron valores repetidos de longitudes de onda en el espectro NIR entre 1315 y 1538 nm, lo que también puede interpretarse como el pico observado aproximadamente a 1450 nm en el espectro NIR. Los picos localizados a valores cercanos a 970 y a 1450 nm, ya observados en la figura 6 y 7, pueden relacionarse a la gran capacidad de

absorción del enlace O-H del agua en un alimento rico en dicho compuesto como es la leche (Melfsen *et al.*, 2012).

Tabla 3. Resultados de los modelos PLS para la calibración, validación cruzada y predicción en el rango VIS, VIS-NIR y NIR para los diferentes parámetros de detección.

		#W	#L V	CALIBRACIÓN		VALIDACIÓN		PREDICCIÓN	
				R ²	RMSEC	R ²	RMSECV	R ²	RMSEP
VISIBLE	CMS	39	6	0.955	2.641	0.951	2.759	0.961	2.412
	ESD	39	7	0.954	3.441	0.951	3.592	0.949	3.640
	DENSIDAD	39	7	0.9577	0.0011	0.9546	0.0011	0.9529	0.0011
	PUNTO DE CONGELACIÓN	39	7	0.930	0.019	0.92	0.02	0.92	0.02
VISIBLE-NIR	CMS	277	5	0.854	4.737	0.842	4.939	0.858	4.655
	ESD	277	5	0.864	5.972	0.853	6.221	0.874	5.721
	DENSIDAD	277	5	0.861	0.002	0.850	0.002	0.866	0.002
	PUNTO DE CONGELACIÓN	277	5	0.83	0.03	0.82	0.03	0.84	0.03
NIR	CMS	214	7	0.933	3.168	0.927	3.313	0.935	3.139
	ESD	214	7	0.931	4.21	0.925	4.409	0.938	3.989
	DENSIDAD	214	7	0.9296	0.0014	0.9232	0,0014	0.9323	0.0014
	PUNTO DE CONGELACIÓN	214	7	0.91	0.02	0.90	0.02	0.91	0.002

Tabla 4. Longitudes de onda (nm) seleccionadas en los modelos estadísticos.

	CMS	PC	DENSIDAD	ESD
VIS	470,490,560, 610,680,710	520,560,610,620, 690,710	490,560, 610,680,700	470,490, 530,560, 610,690,710
VIS-NIR	627,822,872, 957,976	645,840,874, 918, 956,976 ,1050	645,767,874,9 18, 956 , 976 ,1031	645,820,840,874, 956,976 ,1031
NIR	955 ,1184, 1315,1399 , 1465 ,1686	970 ,1184, 1315 , 1399,1455,1538 , 1612	970 ,1184, 1315 , 1548 ,1612	970 ,1028, 1184, 1315 , 1396 ,1649

Finalmente, se generaron de nuevo los modelos estadísticos para el conjunto de longitudes de onda seleccionadas (tabla 5). En la Tabla 5 se observa cómo dichos modelos poseen valores de predicción muy similares a los modelos creados a partir de todo el espectro, incluso alcanzando valores superiores del R² para el rango VIS-NIR y para los cuatro índices de detección de adulteración. Observando cada uno de los parámetros comentados, se puede afirmar que los modelos propuestos son lo suficientemente precisos y robustos debido a los altos valores de coeficientes de regresión, a los bajos valores de los errores cuadráticos medios y al bajo número de variables latentes obtenido. La selección de

longitudes de onda no varía significativamente la precisión del modelo, por lo que se puede afirmar la validez de los modelos propuestos.

Tabla 5. Resultados de los modelos PLS para la calibración, validación cruzada y predicción en el rango VIS, VIS-NIR y NIR para los diferentes parámetros de detección utilizando las longitudes de onda óptimas.

		#W	#LV	Calibración		Validación cruzada		Predicción	
				R ²	RMSEC	R ²	RMSECV	R ²	RMSEP
VISIBLE	CMS	6	4	0.925	3.397	0.923	3.464	0.930	3.266
	ESD	7	5	0.916	4.687	0.913	4.765	0.916	4.664
	DENSIDAD	5	4	0.904	0.0016	0.900	0.0017	0.899	0.0017
	PUNTO DE CONGELACIÓN	6	5	0.870	0.03	0.86	0.03	0.880	0.03
VISIBLE-NIR	CMS	5	3	0.839	4.967	0.836	5.024	0.859	4.642
	ESD	7	3	0.866	5.916	0.862	6.025	0.879	5.618
	DENSIDAD	7	3	0.865	0.002	0.860	0.002	0.871	0.0019
	PUNTO DE CONGELACIÓN	7	3	0.830	0.03	0.83	0.03	0.850	0.02
NIR	CMS	6	5	0.928	3.294	0.926	3.348	0.923	3.447
	ESD	6	5	0.907	4.904	0.904	4.998	0.920	4.565
	DENSIDAD	5	5	0.921	0.0014	0.918	0.0015	0.918	0.0015
	PUNTO DE CONGELACIÓN	7	5	0.900	0.02	0.900	0.02	0.900	0.02

Las Figuras 8, 9 y 10 muestran los resultados de los modelos PLS para la predicción de los parámetros de detección de adulteraciones para las leches estudiadas en el rango del visible (figura 8), rango VIS-NIR (Figura 9) y rango NIR (Figura 10). Dichas figuras muestran la eficiencia de los modelos PLS para la predicción de los parámetros. En las figuras, el eje de ordenadas y de abscisas representan los valores ajustados predichos y medidos respectivamente. La correlación entre los valores medidos y predichos para cada parámetro muestra un buen rendimiento de la predicción.

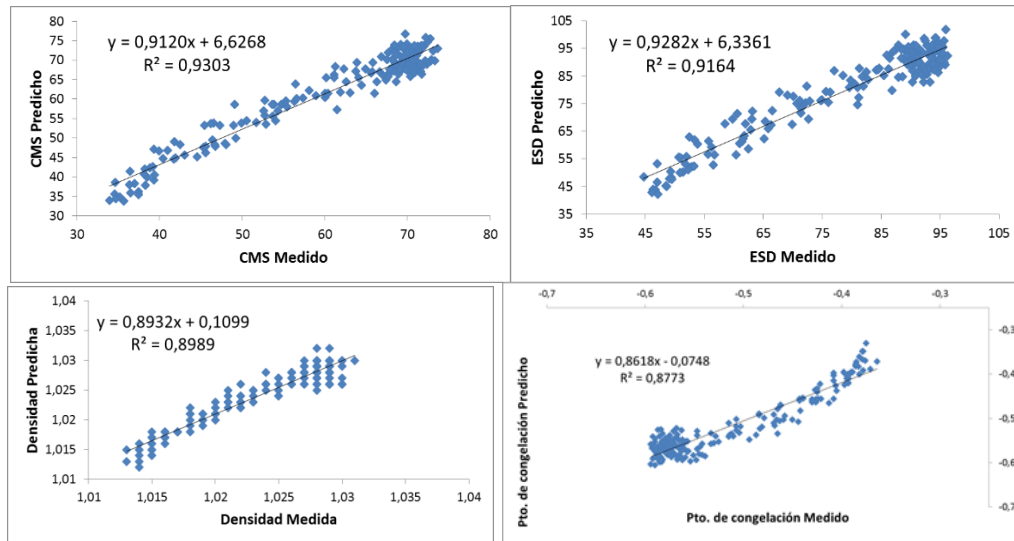


Figura 8. Resultados de los modelos PLS para la predicción de los parámetros de detección de adulteración para el rango VIS.

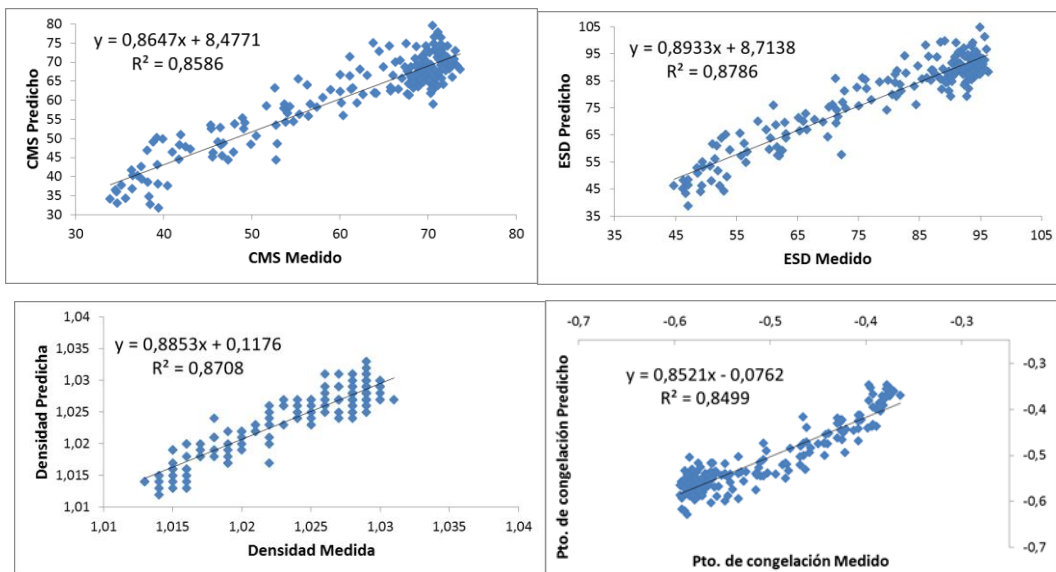


Figura 9. Resultados de los modelos PLS para la predicción de los parámetros de detección de adulteración para el rango VIS-NIR.

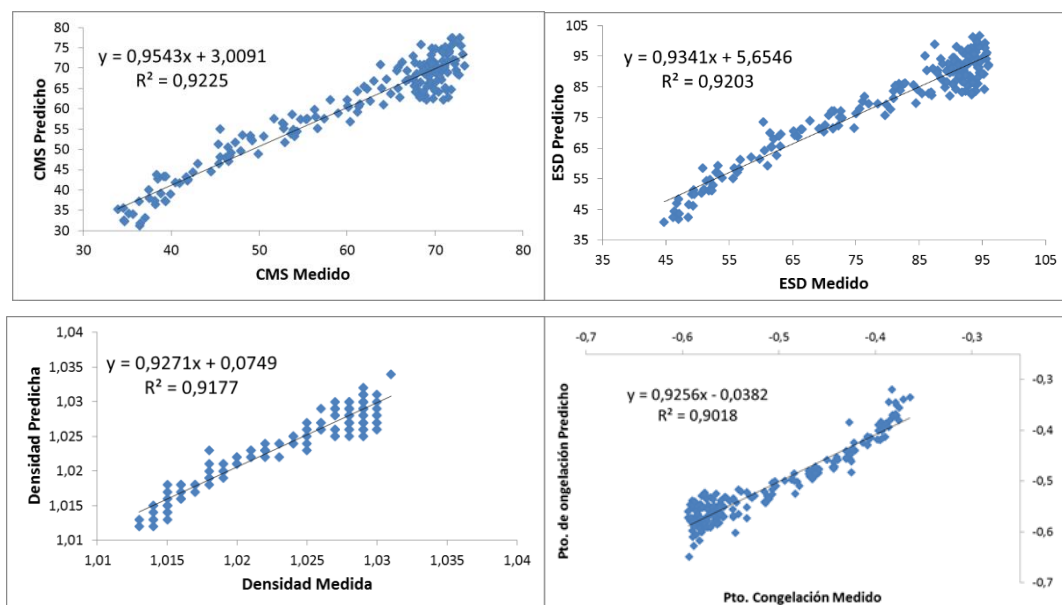


Figura 10. Resultados de los modelos PLS para la predicción de los parámetros de detección de adulteración para el rango NIR.

4. CONCLUSIONES

En este trabajo, se han utilizado diferentes parámetros para detectar la adulteración de leche por aguado (CMS, ESD, Densidad y PC). Se ha comprobado que todos ellos han sido capaces de detectar la adulteración de la leche a niveles inferiores al 10%. Se intentó evaluar la adulteración de las leches mediante cambios de color. El análisis de las coordenadas del espacio de color CIEL*a*b* ha demostrado ser insuficiente para detectar la adulteración de las muestras de leche. Parámetros como el índice de Blancura (WI) y la diferencia de color (ΔE), dependientes de dichas coordenadas, no han mostrado diferencias significativas a medida que se aumentaba el porcentaje de agua añadida por lo que no se consideran aptos como parámetros para la detección del aguado. Con el fin de evaluar de forma no destructiva la adulteración de las leches, se relacionaron los espectros completos VIS, VIS-NIR y NIR, así como seleccionando las longitudes de onda más características con los parámetros de detección de adulteraciones mediante modelos estadísticos a partir de análisis multivariantes, obteniéndose buenas correlaciones con valores de R² entre 0.85 y 0.93, y con bajos valores de errores cuadráticos medios. Por lo tanto, a la vista de los resultados expuestos, se puede considerar la espectroscopia en el rango visible y de infrarrojo cercano como una técnica válida para la detección de la adulteración por aguado en la leche.

5. REFERENCIAS

- Abdi, H. 2010. Partial least squares regression and projection on latent structure regression (PLS Regression). *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 2(1), 97-106.
- Astigarraga, L. 2011. El manejo de la alimentación para modificar la composición química de la leche. *Curso de producción lechera*. Departamento de producción animal y pasturas Facultad de agronomía. Udela. Uruguay.
- Alais, Ch. 1985. Ciencia de la leche. Reverté; Barcelona.
- Belitz, D., Grosch, W. 2013. Food Chemistry. Springer. Berlin.
- BOE, Boletín Oficial del Estado, 20 de julio de 1977. Métodos oficiales de análisis de aceites y grasas, cereales y derivados, productos lácteos y productos derivados de la uva, establecidos por Orden de 31 de Enero de 1977. BOE-A-1977-16116.
- Das, S., Sivaramakrishnaa, M., Biswasb, K., Goswamia, B. 2011. Performance study of a 'constant phase angle based' impedance sensor to detect milk adulteration. *Sensors and Actuators A*, 167, 273–278.
- Das, S., Sivaramakrishnaa, M., Biswasb, K., Goswamia, B. 2014. A low cost instrumentation system to analyze different types of milk adulteration. *ISA Transactions*, 56, 268–275.
- DIN (1969). Milk Butyrometers 0-5 % and Above. DIN 12836-1:1969-12. Berlin.
- Etzion, Y., Linker, R., Cogan, U., Shmulevich, I. 2004. Determination of protein concentration in raw milk by mid-infrared Fourier transform infrared/ attenuated total reflectance spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 87, 2779–2788.
- Helbing, W., Burkart, A. 1985. Tablas químicas para laboratorio e industria. Reverté; Barcelona.
- Hsieh, C. L., Hung, C. Y., Kuo, C. Y. 2011. Quantization of adulteration ratio of raw cow milk by least squares support vector machines (LS-SVM) and visible/near infrared spectroscopy. *International Federation for Information Processing*, 363, 130–139.
- Jääskeläinen, A. J., Peiponen, K. E., Rätty, J. A. 2001. On reflectometric measurement of a refractive index of milk. *Journal of Dairy Science*, 84(1), 38e43.
- Kamthania, M., Saxena J., Saxena, K., Sharma, D.K. 2014. Milk Adulteration: Methods of Detection & Remedial Measures. *National Conference on Synergetic Trends in engineering and Technology (STET-2014) International Journal of Engineering and Technical Research*.
- Kawasaki, M., Kawamura, S., Tsukahara, M., Morita, S., Komiya, M., Natsuga, M. 2008. Near-infrared spectroscopic sensing system for on-line milk quality assessment in a milking robot. *Computers and Electronics in Agriculture*, 63, 22-27.
- Mabrook, M. F., Petty, M. C. 2003. A novel technique for the detection of added water to full fat milk using single frequency admittance measurements. *Sensors and Actuators B*, 96, 215–218.

- MacMahon, S., Begley, T. H., Diachenko, G. W., Stromgren, S. A. 2012. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of economically motivated adulteration in protein-containing foods. *Journal of Chromatography A*, 13, 101–107.
- McDonald R, Smith KJ. 1995. CIE94 – a new color difference formula. *J. Soc. Dyers Col.*, 111, 376-379.
- Melfsen, A., Hartung E., Haeussermann A. 2012. Accuracy of in-line milk composition analysis with diffuse reflectance near-infrared spectroscopy. *J. Dairy Sci.* 95, 6465–6476.
- Robinson, R. A., Stokes, R.H. 1965. *Electrolyte solutions*. Butterworths Publications Ltd., London.
- Sadat, A; Mustajab, P; & Khan, I. A. 2006. Determining the adulteration of natural milk with synthetic milk using ac conductance measurement. *Journal of Food Engineering*, 77, 472–477.
- Santos, P. M., Wentzell, P. D., Pereira-Filho, E. R. 2011. Scanner digital images combined with color parameters: A case study to detect adulterations in liquid cow' s milk. *Food Analytical Methods*, 5, 89–95.
- Santos, P.M; Pereira-Filho, E.R; Rodriguez-Saona, L.E. 2012. Rapid detection and quantification of milk adulteration using infrared microspectroscopy and chemometrics analysis. *Food Chemistry*, 138, 19–24.
- Santos P M; Pereira-Filho E R; Rodriguez-Saona, L. E. 2013. Application of Hand-Held and Portable Infrared Spectrometers in Bovine Milk Analysis. *J. Agric. Food Chem.* 61, 1205–1211.